

Aus der Frauenklinik der
Justus Liebig - Universität
Gießen
Direktor: Professor Dr. R. Kepp

TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR REGENERATION DES EILEITEREPITHEL

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des
Bereichs Humanmedizin
der
Justus Liebig-Universität
Gießen

vorgelegt von
Renate Grund
aus Milda

Gießen 1972

Aus der Frauenklinik der
Justus Liebig - Universität
Gießen
Direktor: Professor Dr. R. Kepp

TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR REGENERATION DES EILEITEREPITHEL

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des
Bereichs Humanmedizin
der
Justus Liebig-Universität
Gießen

vorgelegt von
Renate Grund
aus Milda

Gießen 1972



Dekan: Prof. Dr. Hj. Staudinger
Referent: Prof. Dr. H. Koester
Korreferent: Prof. Dr. Dr. H.-R. Duncker

I. Einleitung	3
1. Der zelluläre Aufbau der Tubenschleimhaut	3
2. Zyklische Veränderungen im Epithelaufbau und Theorien über deren Entstehung	5
3. Mitoserate des Tubenepithels	8
II. Fragestellung	9
III. Methode	11
1. Das Versuchstier	11
2. Durchführung des Versuches	11
3. Anfertigung der Autoradiogramme	12
4. Kernmarkierung durch H^3 -Thymidin	13
5. Technische Daten des verwandten H^3 -Thymidin	13
6. Die Entstehung der Autoradiogramme	14
7. Die Expositionszeit	14
8. Färbung und Auswertung der Autoradio- gramme	15
IV. Ergebnisse	17
V. Besprechung der Ergebnisse	21
VI. Zusammenfassung	25
VII. Literaturverzeichnis ..	26
VIII. Lebenslauf	32

I. E i n l e i t u n g

SCHRÖDER (1930) hat den menschlichen Eileiter als ein etwa zwölf cm langes, rundes Schlauchorgan beschrieben. Die Schleimhaut der Tube bildet zahlreiche Falten und Zotten, welche das Tubenlumen weitgehend ausfüllen (KIPFER 1950).

1. Der zelluläre Aufbau der Tubenschleimhaut

Die Schleimhaut der Tube besteht aus einem einschichtigen Epithel, über dessen zellulären Aufbau zahlreiche Veröffentlichungen vorliegen.

Erstmals berichteten NEUMANN (1875) und STÜVE (1889), daß im Epithel von Amphibientuben neben Flimmerepithelzellen auch sezernierende Zellen zu finden seien.

Als dritte Zellart haben FRÖMMELE (1886), VOINOT (1900) und NOVAK und EVERETT (1928) die Stäbchen-oder Stiftzelle beschrieben. Nach HOLZBACH (1908), TRÖSCHER (1917), NOVAK und EVERETT (1928), PAPANICOLAOU, TRAUT und MARCHETTI (1948), sowie FLERKO (1955) stellen diese Zellen den Endzustand der Sekretzellen dar. TRÖSCHER (1917) hält sie auch für den Endzustand der Flimmerepithelzellen. Elektronenmikroskopisch konnte ENBERGS (1968) an einigen Stäbchenzellen Mikrovilli und an anderen Kinozilien nachweisen.

Die als „ Helle Zellen“ bezeichneten Zellelemente wurden von IAWATA (1929), von MIHALIK (1934/35, 1936), FEYRTER (1938, 1951), SCHLEMMINGER (1943), MÜLLER (1952), MILLESI (1953) und FLERKO (1955) beschrieben. Während FEYRTER (1938, 1951) und MÜLLER (1952) glauben, daß diese Zellen zu einem „ diffusen endokrinen epithelialen Organ“ gehören,

sieht sie von MIHALIK (1934/35, 1936), der in diesen Zellen Flimmerblasen beschrieb, im Zusammenhang mit der Regeneration der Flimmer-epithelzellen. Auch MILLESI (1953) bezeichnet sie als Flimmerersatzzellen. FLERKO (1955) billigt ihnen auch eine Bedeutung für die Bildung von Sekretzellen zu.

Bei den Veröffentlichungen über elektronen-mikroskopische Befunde am Tubenepithel besteht Einigkeit in Bezug auf den Feinbau der Kinozilien der Flimmerepithelzellen, die sich nicht von denen anderer Flimmerepithelien unterscheiden (BORELL, NILSSON, WERSÄLL und WESTMAN 1956, FAWCETT und PORTER 1954, HASHIMOTO und Mitarbeiter 1964, STEGNER 1961, 1962, FREDRICSSON und BJÖRKMANN 1962, OVERBECK 1967 und ENBERGS 1968): Neun Fibrillenpaare umgeben konzentrisch ein zentrales Fibrillenpaar. Dieses endet unterhalb der Zelloberfläche in einem sogenannten Basalkörperchen. Die Außenfläche der Kinozilien geht kontinuierlich in die oberflächliche Zellmembran über. Nach STEGNER (1961) werden im Stadium der Ausdifferenzierung die Zilien aus unbekannten Vorstufen innerhalb des Zytoplasmas gebildet. Sie gelangen erst sekundär an die Zelloberfläche. Der Flimmerkranz ist in den Interzellulärspalt geöffnet und kann deshalb lichtmikroskopisch leicht als interzelluläre Flimmerblase imponieren. OVERBECK (1967), der ebenso wie STEGNER (1961), an embryonalen menschlichen Tuben elektronen-mikroskopische Untersuchungen vornahm, berichtet, daß vom 5. Embryonalmonat an in einigen Epithelzellen eine Neubildung von Basalkörperchenstrukturen einsetzt, aus denen sich Flimmerhaare formieren und differenzieren. Unter gleich-

zeitiger Vakuolenbildung entstehen Flimmerblasen mit dichter wandständiger Zilienauskleidung. Die Flimmerblasen wandern zur Zelloberfläche und brechen dort auf, was zur Bildung des oberflächlichen Flimmersaumes der Zilienzellen führt. Diese elektronenmikroskopischen Befunde entsprechen den lichtmikroskopischen Beobachtungen von SCHULTKA (1963) und SCHULTKA und SCHARF (1963), während ENBERGS (1968) bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen Flimmerblasen nicht beobachtete.

2. Zyklische Veränderungen im Epithelaufbau und Theorien über deren Entstehung

Auf Veränderungen im Aufbau der Tubenschleimhaut während des Zyklus wurde von SCHAFFER (1908), JÄGEROOS (1912), TRÜSCHER (1917) und SCHRÖDER (1930) hingewiesen. Diese Veränderungen waren in der Folgezeit häufig Gegenstand wissenschaftlicher Erörterungen. Über Ausmaß und Entstehung bestehen recht konträre Auffassungen.

Eine große Gruppe von Autoren hält die Flimmer-epithelzellen und Sekretzellen für verschiedene Funktionsphasen einer Zellart, wobei sich Flimmer-epithelzellen zu Sekretzellen umwandeln können (NEUMANN 1875, LINARI 1904, GIANELLI 1907, MOREAUX 1910, WESTMANN 1916, COHNEN 1927 und WALTER 1929). Aufgrund ausgedehnter morphologischer und topochemischer Untersuchungen wird diese Meinung auch von SCHULTKA (1963) und SCHULTKA und SCHARF (1963) vertreten. Sie berichten, daß sich der Flimmerbesatz der zilien-tragenden Zellen zu Sekret umwandeln könne. Dabei kommt es zunächst zu einer Verdickung der

Zilienspitzen, die dann von proximal nach distal fortschreitet, bis die Zilien in ganzer Länge aufgetrieben sind und zu Sekret eingeschmolzen werden. Das Sekret wird in Form von Tröpfchen oder Granula durch Abschnürung frei. Dieser Vorgang wird als „Flimmersekretion“ bezeichnet und führt zu einer flimmerlosen zylindrischen Zelle, die den Ausgangspunkt des weiteren Sekretionsvorgangs bildet und die eigentliche Sekretzelle darstellt. Im proximalen Abschnitt dieser flimmerlosen Zelle wird nun Sekret gebildet, was durch Abschnürung von Sekretgranula abgegeben wird. Die Autoren sprechen dabei von „Ballonsekretion“. Bei einigen Zellen ergießt sich das Sekret ohne Ballonbildung in das Tubenlumen. Die sezernierenden Zellen überdauern einige Zyklen, bis aus ihnen Stäbchenzellen entstehen, die dann aus dem Epithelverband gelöst werden. Die Regeneration der Zilienzellen erfolgt durch mitotische Teilung. Prämitotisch entstehen aus den Flimmerepithelzellen Zellen, die den „Hellen Zellen“ entsprechen und als „Flimmerersatzzellen“ bezeichnet werden (MILLES 1953).

Für die Umwandlungstheorie könnten auch elektronenmikroskopische Befunde von MERCHANT (1969) sprechen, der bei Kaninchentuben im isthmischen Abschnitt 72 Stunden nach der Kopulation Sekretgranula in Zilienzellen, sowie einige mit einem Zilium besetzte Sekretzellen fand.

Gegen die Umwandlung von Flimmerzellen zu sezernierenden Zellen sprechen sich SNYDER (1923, 1924), NOVAK und EVERETT (1928), PAPANICOLAOU, TRAUT und MARCHETTI (1948) aus. Nach ihrer

Meinung baut sich das Tubenepithel aus eigenständigen Zelltypen auf. Während des Zyklus kommt es lediglich zu Schwankungen des Zellvolumens und der Zellhöhe, sowie zu unterschiedlichen Sekretionsleistungen der zilienfreien Zellen.

Skeptisch steht auch FREDRICSSON (1959) einer Umwandlung der Flimmerepithelzellen zu Sekretzellen gegenüber. Er konnte durch Östrogengaben bei kastrierten Kaninchen eine zahlenmäßige Zunahme der sezernierenden Zellen erreichen, ohne daß ein Anstieg der Mitoserate zu beobachten war. In den sich unter Östrogengaben teilenden Zellen fand er mehr Zellen, in denen Sekretgranula nachweisbar waren, als in den sich nicht teilenden Zellen.

PAUERSTEIN und WOODRUFF (1967) glauben dagegen, daß sich weder Sekret- noch Flimmerepithelzellen mitotisch teilen können. Sie vertreten die Auffassung, daß die Regeneration des Tubenepithels durch Teilung von „ indifferenten Zellen“, die nahe der Basalmembran liegen, erfolge. Sie fanden, daß nur diese Zellen Acridinorange einlagern, d.h. DNS synthetisieren. Auch H^3 -Thymidineinlagerungen konnten sie nur in diesen Zellen beobachten. 1963 waren BERTALANFFY und LAU mit Hilfe der Colchizintechnik zu vergleichbaren Ergebnissen gekommen. PAUERSTEIN und WOODRUFF räumen den „ indifferenten Zellen“ auch eine Bedeutung für die Regeneration des Stromas ein.

Aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen beschrieb STEGNER (1962) zyklische Veränderungen innerhalb der Sekretzellen. Dabei kommt es in

diesen Zellen als Zeichen einer gesteigerten sekretorischen Leistung postovulatorisch zu einer mächtigen Ausprägung des Golgikomplexes, was auch von FREDRICSSON (1959) beschrieben wurde. Die von STEGNER (1961, 1962) an menschlichen Tuben erhobenen Befunde stimmen mit Ergebnissen von BORELL, NILSSON, WERSÄLL und WESTMAN (1956) ausgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Kaninchentuben völlig überein. NILSSON und RUTBERG (1960) berichten über zyklusabhängige Veränderungen in Dichte und Größe der Sekretgranula in den zilienfreien Zellen. HASHIMOTO und Mitarbeiter (1964) fanden bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen keine wesentlichen Unterschiede der Flimmerepithelzellen in den verschiedenen Abschnitten der Tube während der Menstruation und der Frühschwangerschaft.

Elektronenmikroskopisch sind also charakteristische Veränderungen innerhalb der Sekretzellen nachweisbar, während die Flimmerepithelzellen die verschiedenen Phasen des Zyklus ohne derartige Veränderungen durchlaufen.

3. Mitoserate des Tubenepithels

Über die Anzahl der Zellteilungen im Tubenepithel berichtet schon IAWATA (1929), daß er selten Kernteilungsfiguren entdecken konnte. BERTALANFFY und LAU (1963) ermittelten mit Hilfe der Colchizintechnik an Rattentuben eine Zellteilungsrate, die während des Zyklus leichte Schwankungen aufwies und zwischen 1,1% und 1,9% lag. FREDRICSSON (1959) gibt die Häufigkeit der Mitosen, ebenfalls unter Anwendung der Colchizintechnik, im ampullären Abschnitt der Kaninchentube mit 0,14% bis 1,16 % an. KURY und REV-KURY (1969) fanden autoradiographisch bei operativ gewonnenen menschlichen Tuben H^3 -Einklagerungen in 0,5 % bis 1,8 % der Kerne.

II. F r a g e s t e l l u n g

Über die Art der erstmals von SCHAFFER (1908), JÄGEROOS (1912) und TRÖSCHER (1917) beschriebenen zyklischen Veränderungen im Tubenepithel bestehen gegensätzliche Auffassungen. Im Zusammenhang mit der Entstehung dieser Veränderungen wird auch die Frage nach der Epithelregeneration unterschiedlich beantwortet.

Die Anhänger der Umwandlungstheorie, die die Meinung vertreten, daß Flimmerepithel- und Sekretzellen verschiedene Funktionsphasen einer Zellart darstellen (NEUMANN 1875, LINARI 1904, GIANELLI 1907, MOREAUX 1910, WESTMANN 1916, COHNEN 1927, WALTER 1929, von MIHÁLIK 1934/35, 1936, MILLESI 1953, SCHULTKA 1963, SCHULTKA und SCHARF 1963), glauben, die Epithelregeneration gehe von Ersatzzellen aus. Aus diesen Ersatzzellen entstehen in jedem Falle Zilienzellen. Ein Teil dieser Zilienzellen wandelt sich dann zu Sekretzellen um, was durch Einschmelzung des Flimmerbesatzes zu Sekret möglich ist.

Dieser Regenerationsmodus wird von STEGNER (1961), der bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen keine Übergangszelltypen nachweisen konnte, abgelehnt. Da es FREDRICSSON (1959) gelang, in sich teilenden Zellen der Kaninchentube Sekretgranula nachzuweisen, spricht er sich für die Teilungsfähigkeit der Sekretzellen aus. Im Gegensatz dazu nehmen BERTALANFFY und LAU (1963) und PAUERSTEIN und WOODRUFF (1967) an, die Epithelregeneration erfolge durch Teilung nahe der Basalmembran gelegener Zellen. Aus diesen sogenannten „ indifferenten“ Zellen entstehen dann Flimmerepithel- und Sekretzellen.

PAUERSTEIN und WOODRUFF (1967) halten diese „ indifferenten Zellen“ auch für die Regeneration des Stromas für bedeutungsvoll.

KURY und REV-KURY (1969) widersprechen PAUERSTEIN und WOODRUFF (1967) insoweit, als sie unter Anwendung von H^3 -Thymidin, autoradiographisch nicht nur in diesen „ indifferenten Zellen“, sondern auch über den Kernen anderer Epithelzellen Kernmarkierungen fanden. Sie vermuten, daß es sich dabei um Kerne von Flimmerepithel- und Sekretzellen handelt. Eine genaue Aussage war ihnen jedoch nicht möglich, da die Kernmarkierungen so stark waren, daß auch das Zytoplasma der dazugehörigen Zellen durch die Schwärzung der Filmschicht verdeckt wurde.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit soll es sein, eine genaue Aussage darüber zu machen, in welchen Zelltypen der Tubenschleimhaut mit H^3 -Thymidin markierte Kerne zu finden sind. Damit soll gleichzeitig zur Frage der Regenerationsfähigkeit der verschiedenen Epithelzellen und damit auch zur Frage der Umwandlungstheorie Stellung genommen werden.

III. M e t h o d e

1. Das Versuchstier

In Vorversuchen wurden die Eileiter von 20 Albinomäusen untersucht. Das Gewicht der Tiere lag zwischen 25 und 30 Gramm. Die Phasen des Mäusezyklus, der vier bis sechs Tage lang ist, wurde durch Auswertung von Vaginalabstrichen bestimmt. Zur Versuchsdurchführung wurden Mäuse gewählt, die sich im Östrus befanden. Da jedoch zur Ausarbeitung einer neuen, die Eigenschaften des Filmmaterials berücksichtigende und gleichzeitige differenzierende Färbemethode eine große Zahl von Autoradiogrammen benötigt wurde, erwies sich der sehr kleine Mäuseeileiter als unzweckmäßig.

Der größere Eileiter des Kaninchens bot sich daher an. Außerdem besteht beim Kaninchen eine sogenannte provozierte Ovulation, d.h. es wird durch die Kopulation eine Ovulation ausgelöst. Im Mittel kommt es zehn Stunden nach dem Deckakt zur Ovulation (ZIMMERMANN 1959). Der Zeitpunkt der Ovulation war zur Versuchsdurchführung deshalb besonders geeignet, weil nach MILLESI (1953) Mitosen im Eileiterepithel dann häufiger beobachtet werden.

Der Versuch wurde an einem 2 900 Gramm schweren Bastardkaninchen durchgeführt, dessen Geschlechtsreife durch das Zustandekommen der Kopulation erwiesen war.

2. Durchführung des Versuches

Zehn Stunden nach der Kopulation wurden dem Kaninchen 1 mC H^3 -Thymidin pro kg Körpergewicht

in die Ohrvene injiziert. Eine Stunde danach wurde das Tier durch intravenöse Gabe von 1,0 gr Thiogenal getötet und durch Eröffnung der Halsgefäße ausgeblutet. Die Tuben wurden durch einen Bauchschnitt entnommen, jede in fünf, etwa gleichlange Stücke zerteilt.

Die Fixation der Tubenteile erfolgte in dem von BOUIN angegebenen Gemisch aus Essigsäure, Formol und Pikrinsäure. Das Material wurde entsprechend dem Fixationsgemisch in drei Chargen 80%igem Alkohol entwässert und über 96%igen und absoluten Alkohol für die Dauer von 30 Minuten in Chloroform gebracht. Danach erfolgte die Einbettung in Hartparaffin mit einem Schmelzpunkt von 56 °C.

Nach Aufblockung der Tubensegmente wurden von allen zehn Blöckchen 4 μ bis 5 μ dicke Schnitte angefertigt. Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte in typischer Weise.

3. Anfertigung der Autoradiogramme

Zur Herstellung der Autoradiogramme wurde die von PELC (1947) angegebene „ Stripping-Film“- Methode benutzt. Histologische Schnitte von 4 μ bis 5 μ Dicke wurden nach der Entparaffinierung in der Dunkelkammer in Kontakt mit einer Filmschicht gebracht. Dazu wurden von dem auf Glasplatten aufgezogenen KODAK-Autoradiographie-stripping-film AR 10 Stücke entsprechender Größe abgelöst und im Aqua-destillata-Bad zum Schwimmen gebracht. Dabei lag die empfindliche Filmschicht dem Wasser direkt auf. Durch Unterfahren mit dem Objektträger

kam diese dann direkt auf dem Gewebsschnitt zu liegen. Die Präparate wurden dann in lichtgeschützten Kästen getrocknet und während der Expositionszeit bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt.

4. Kernmarkierung durch H^3 -Thymin

Seit REICHARD und ESTBORN (1951) nachwiesen, daß Tieren injiziertes Thymin nur zur Desoxyribonucleinsäuresynthese verwendet wird, und da in der Regel eine DNS-Synthese als Vorbereitung einer Zellteilung aufzufassen ist (HOWARD und PELC 1951, HUGHES und Mitarbeiter 1958) sind unter Anwendung von radioaktiv markiertem Thymin Regenerationsvorgänge zahlreicher Gewebe studiert worden.

Injiziert man einem Versuchstier den radioaktiv markierten DNS-Baustein H^3 -Thymin, so wird dieser in die Kerne der Zellen eingebaut, die sich zum Zeitpunkt der Injektion auf eine Zellteilung vorbereiten. Der Prozentsatz der teilungsbereiten Zellen gibt Aufschluß über die Zellneubildungsrate des Gewebes.

5. Technische Daten des verwandten H^3 -Thymin

Das injizierte Thymin war in der Position 6 durch Tritium markiert und papierchromatographisch gereinigt. Seine spezifische Aktivität betrug 5,0 C pro mMol. In sterilem Aqua destillata gelöst lag die radioaktive Konzentration bei 1 mC pro ml Lösung. Das zur Markierung benutzte Tritium ist ein sehr weiche β -Strahler von 0,018 MeV mit einer Halbwertszeit von 12,3 Jahren.

6. Die Entstehung der Autoradiogramme

Die Einwirkung ionisierender Strahlen auf eine Fotoemulsion erzeugt, ähnlich wie das sichtbare Licht, auf dieser ein latentes Bild, das durch ein Reduktionsmittel sichtbar gemacht werden kann. Beim Durchgang eines geladenen Teilchens werden in der Fotoemulsion enthaltene Silberbromidkristalle getroffen und ionisiert. Während des Entwicklungsvorganges entsteht aus dem ionisierten Silberbromidpartikeln durch Reduktion elementares Silber, welches in Form von Fäden aus dem Bromsilberkorn herauswächst (KLEIN 1958, MÜLLER 1962). Die zu elementarem Silber reduzierten Silberionen sind lichtmikroskopisch als schwarze Punkte erkennbar. Das nicht reduzierte Silberbromid wird im Fixierbad in eine lösliche Verbindung überführt und entfernt.

Die vom Tritium ausgehende weiche β -Strahlung, die eine maximale Reichweite von 8 μ hat (LAJTHA und OLIVER 1959), führt zu einer punktförmigen Schwärzung über den Kernen, die mit Tritium markiertes Thymidin eingelagert haben.

7. Die Expositionszeit

Nachdem die histologischen Schnitte in typischer Weise mit dem Stripping-film in Kontakt gebracht worden waren, wurden sie bei Kühlschranktemperatur gelagert. Die Dauer der Expositionszeit ist abhängig von der spezifischen Aktivität des benützten H^3 -Thymidins. In Vorversuchen hatte sich eine Expositionszeit von 21 Tagen als zweckmäßig erwiesen.

8. Färbung und Auswertung der Autoradiogramme

Die Autoradiogramme wurden angefertigt um festzustellen, in welchen Zellen markierte Kerne zu finden sind. Dazu mußte eine Differentialfärbung der Autoradiogramme vorgenommen werden.

Die üblicherweise zur Färbung von Autoradiogrammen verwendete HE-Färbung ermöglicht keine exakte Unterscheidung der Flimmerepithel- von den Sekretzellen. Sie ist deshalb zur Lösung der Fragestellung ungeeignet.

Von den zur Differenzierung der beiden Zelltypen häufig angewandten Färbungen ist die von McMANUS (1946) und HOTCHKISS (1948) angegebene PAS-Reaktion ungeeignet, weil die Filmschicht durch die in der Färbereihe enthaltenen Säuren zerstört wird.

Versuche mit der Trichromfärbung nach MASSON brachten keine brauchbaren Ergebnisse, da die Filmschicht so viel Farbe annahm, daß die Autoradiogramme für eine Auswertung zu dunkel wurden.

Mit der von STEEDMANN (1950) eingeführten Alcian-Blau-Färbung war eine gute Anfärbung des Sekretes zu erreichen, jedoch waren die Zellkerne nur undeutlich zu erkennen und Zellgrenzen kamen nicht zur Darstellung.

Das Vorhaben, eine zur Differentialfärbung von Autoradiogrammen geeignete Farbzusammenstellung zu finden, die eine deutliche Unterscheidung der

Sekret- von den Flimmerepithelzellen ermöglichte, ohne gleichzeitige Überfärbung der Filmschicht, erwies sich als außerordentlich schwierig.

Zahlreiche Farbzusammenstellungen wurden an hunderten von Autoradiogrammen erprobt. Schließlich gelang es, die angestrebte Differenzierung mit der folgenden Färbung zu erreichen:

- a) Kernfärbung : 20 min HARRIS-Hämatoxylin,
2 min Spülen in Aqua dest.
zur Differenzierung kurzes
Eintauchen in 0,5 % HCl
5 min Bläuen in 1,1 %
Lithiumcarbonat-Lösung
2 min Spülen in Aqua dest.
- b) Cytoplasmafärbung : 10 min Azophloxin (0,5 gr
Azophloxin auf 100 ml
Aqua dest. unter Zusatz
von 0,2 ml Eisessig),
5 min 1 % Essigsäure zur
Differenzierung
- c) Sekretfärbung : 60 min 3 % angesäuerte
Alcian-Blau-Lösung
(1 ml Eisessig auf
100 ml der Lösung)
10 min Aqua dest.
- d) Entwässern : 80 % Alkohol, 3 Chargen
96 % Alkohol, absoluter
Alkohol

Danach 10 min Xylol und Einbettung.

IV. E r g e b n i s s e

Im folgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen dargestellt werden und durch Photographien von gefärbten Autoradiogrammen illustriert werden.

Das Epithel der Tuba uterina baut sich aus Flimmer-, Sekret- und Stäbchenzellen sowie nahe der Basalmembran gelegener Zellen auf. Die Relation zwischen Flimmerepithel- und Sekretzellen ist in den verschiedenen Abschnitten des Eileiters unterschiedlich. Während im Epithel der Ampulle Zilienzellen vorherrschen, nimmt die Zahl der Sekretzellen zum Isthmus hin deutlich zu.

Mit H^3 -Thymidin markierte Zellkerne sind im Stroma und im Epithel des Eileiters zu finden. Die Anzahl der markierten Kerne im Epithel ist gering. Besonders wenige Markierungen finden sich jedoch dort, wo das Epithel weitgehend aus Flimmerepithelzellen besteht, d.h. im ampullären Abschnitt der Tube.

Durch die Differentialfärbung der Autoradiogramme kann der Typ der Epithelzellen, deren Kerne markiert sind, bestimmt werden. Markierte Kerne liegen sowohl in Flimmerepithelzellen als auch in Sekretzellen. In dem sekretzellreichen, dem Isthmus nahe gelegenen Epithel sind häufiger markierte Kerne zu finden als im Epithel der Ampulle. Diese Kerne gehören meist zu Sekretzellen.

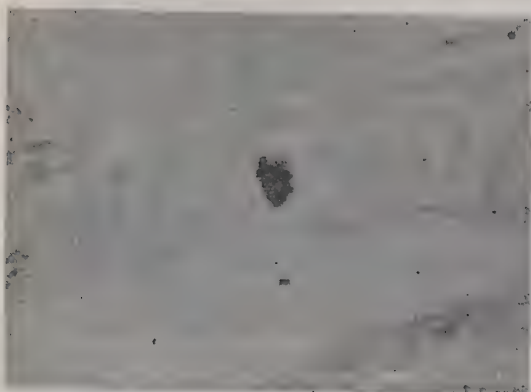
Außer in Sekret- und Zilienzellen sind noch, etwa ebenso häufig, nahe der Basalmembran gelegene mar-

kierte Zellkerne zu finden. Aussagen über den Charakter der zu diesen Kernen gehörigen Zellen sind nicht möglich.

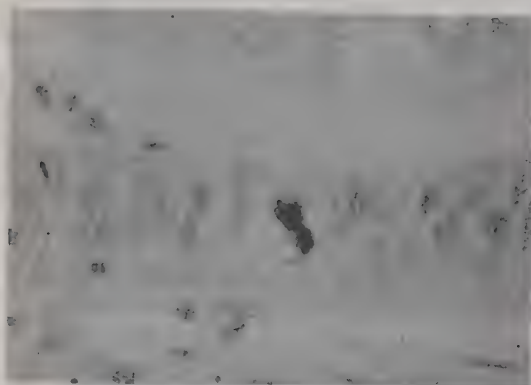
Über Kernen von Stäbchenzellen treten keine Markierungen auf.

Die unter Abbildung I zusammengefaßten Bilder 1 bis 3 zeigen gefärbte Autoradiogramme histologischer Schnitte aus dem ampullären Anteil des Eileiters. Neben unmarkierten Kernen finden sich vereinzelt markierte Kerne von Flimmerepithelzellen. Die Zilien der Flimmerepithelzellen kommen deutlich zur Darstellung. Die Basalkörperchen sind an der Zelloberfläche als roter Streif zu erkennen. Die runde bis ovale Form der Kerne der Flimmerepithelzellen ist auch bei den Markierungen zu sehen. Im Epithelverband sind nur wenige Sekretzellen zu finden. Ihr schwachgefärbtes Sekret wölbt sich pfropfartig in das Lumen der Tube vor.

Die unter Abbildung II zusammengefaßten Bilder 1 bis 3 zeigen gefärbte Autoradiogramme histologischer Schnitte aus dem isthmischen Anteil des Eileiters. Zwischen Gruppen von blaugefärbten Sekretzellen sind einzelne Flimmerepithelzellen, deutlich an ihrem Flimmerbesatz erkennbar, eingelagert. Die Kerne der Sekretzellen liegen basal. Das apikal liegende Sekret ist kräftig blau gefärbt. Einzelne Kerne der Sekretzellen sind markiert.



1

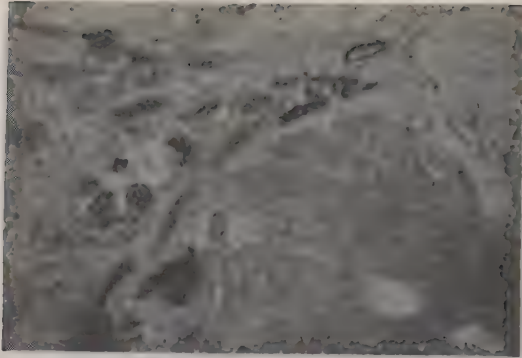


2

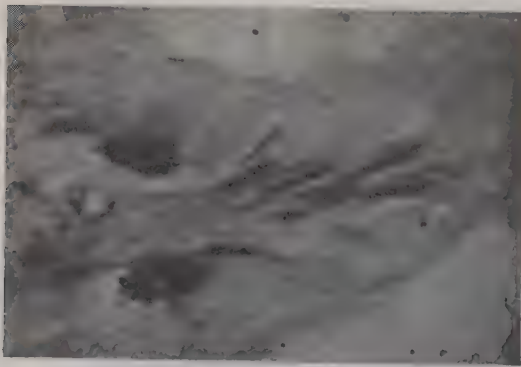


3

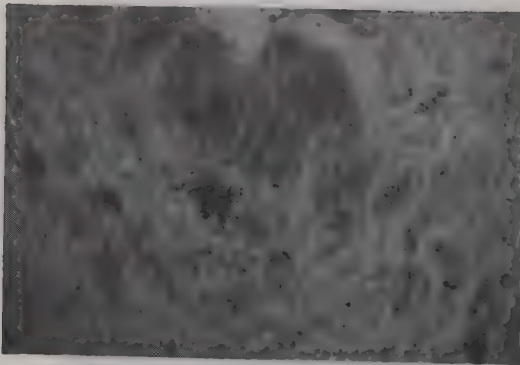
Abbildung I: Schleimhaut des Kanincheneileiters
Gefärbte Autoradiogramme



1



2



3

Abbildung II: Schleimhaut des Kanincheneileiters
Gefärbte Autoradiogramme

V. B e s p r e c h u n g d e r E r g e b n i s s e

Die Frage nach der Regeneration des Tubenepithels wird unterschiedlich beantwortet.

Autoren, die in den verschiedenen Zellarten der Tubenschleimhaut Funktionsphasen eines einheitlichen Zelltypes sehen, stellen ein bestimmtes Funktionsstadium dieses Zelltypes an den Ausgangspunkt der zur Epithelerneuerung führenden Vorgänge (MILLES 1953, SCHULTKA 1963, SCHULTKA und SCHARF 1963). Die Flimmerepithelzellen werden als dieses Funktionsstadium angesehen. Nach Meinung dieser Autoren können nur Flimmerepithelzellen sich mitotisch teilen. Sekretzellen wird diese Fähigkeit abgesprochen. Ihre Neuentstehung wird auf Umwandlung von Flimmerepithelzellen zurückgeführt.

Die von mir autoradiographisch am Epithel des Kanincheneileiters gewonnenen Ergebnisse stehen im Gegensatz zur Auffassung dieser Autoren. H^3 -Thymidin Einlagerungen konnten nicht nur in Kernen von Flimmerepithelzellen, sondern auch in Kernen von Sekretzellen nachgewiesen werden. Dies bedeutet, daß sowohl in Flimmerepithelzellen als auch in Sekretzellen die einer Mitose vorausgehende DNS-Synthese stattfindet.

Schon 1959 hatte FREDRICSSON in sich teilenden Zellen des Kanincheneileiters Sekretgranula nachgewiesen und daraus geschlossen, daß es sich bei diesen Zellen um Sekretzellen handelt.

Einen völlig anderen Regenerationsmodus des Tubenepithels beschreibt BERTALANFFY und LAU (1963)

und PAUERSTEIN und WOODRUFF (1967). Sie beschreiben nahe der Basalmembran des Epithels gelegene Zellen und glauben, daß nur diese Zellen sich mitotisch teilen können. PAUERSTEIN und WOODRUFF (1967) bezeichnen diese Zellen als „ indifferent“, da aus ihnen Flimmerepithel- und Sekretzellen hervorgehen. Sie vertreten die Auffassung, daß diese Zellen einen, dem Stratum basale der Plattenepithelien vergleichbaren Zellverband bilden.

Auch im Epithel der von mir untersuchten Kaninchen-eileiter fanden sich außer in Flimmerepithel- und Sekretzellen markierte Zellkerne in unmittelbarer Nähe der Basalmembran. Ob diese Kerne zu Zellen gehören, die für die Regeneration von Flimmerepithel- und Sekretzellen von Bedeutung sind, d.h. „ indifferent“ genannt werden können, ist nicht zu entscheiden. Da jedoch nicht nur in diesen Zellen Kernmarkierungen zu finden sind, kann man sie wohl nicht mit einem Stratum basale vergleichen, wie PAUERSTEIN und WOODRUFF (1967) es tun.

Die Angaben von KURY und REV-KURY (1969), die bei einer autoradiographischen Untersuchung an menschlichen Eileitern nicht nur Kernmarkierungen in „ indifferenten“ Zellen, sondern auch in anderen Epithelzellen fanden und deshalb meinten, es könne sich dabei um Kerne von Flimmerepithel-, Sekret- und eventuell auch von Stäbchenzellen handeln, stellen eine Vermutung dar. Den Autoren war eine exakte Unterscheidung der Zelltypen nicht möglich ,

weil durch eine zu starke Schwärzung der Filmschicht auch das Zytoplasma der Zellen mit Kernmarkierungen verdeckt wurde.

Vorversuche zu der hier vorliegenden Arbeit haben gezeigt, daß auch dann, wenn die Expositionszeit so kurz gewählt wird, daß es nur zu einer Schwärzung der direkt über dem Kern liegenden Filmschicht kommt, bei Anwendung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung keine exakte Aussage über den Typ der Zelle mit Kernmarkierung möglich ist. Diese Aussage ist nur dann möglich, wenn eine Differentialfärbung der Autoradiogramme - etwa in der Art, wie sie für diese Arbeit ausgearbeitet wurde - vorgenommen wird. Erst durch Anwendung dieser Färbung ließ sich aussagen, daß Kernmarkierungen sowohl in Sekret- und Flimmerepithelzellen als auch in nahe der Basalmembran gelegenen Zellen zu finden sind.

In Kernen von Stäbchenzellen wurden keine H^3 -Thymidin markierte Zellkerne gefunden, was mit der Auffassung, diese Zellen seien der Endzustand der Tubenepithelzellen, in Einklang steht (HOLZBACH 1908, TRÖSCHER 1917, NOVAK und EVERETT 1928, PAPANICOLAOU, TRAUT und MARCHETTI 1948, FLERKO 1955).

Die Zahl der teilungsbereiten Zellen im Epithel der Tuba uterina ist überraschend gering. Sie wird mit Werten um 1 % angegeben (FREDRICSSON 1959, BERTALANFFY und LAU 1963, KURY und REV-KURY 1969). KURY und REV-KURY (1969) fanden diesen Wert auch bei akuten und chronischen entzündlichen Veränderungen an menschlichen Tubenepithelien unverändert. Wahrschein-

lich ist diese niedrige Zellteilungsrate eine Ursache dafür, daß auch geringe entzündliche Reizungen am Eileiter zu schwerwiegenden und dauerhaften funktionellen Störungen führen können.

Bei den hier untersuchten Kanincheneileitern wurden markierte Kerne häufiger in Sekretzellen als in Flimmerepithelzellen gefunden. Dies ist als Folge der zum Zeitpunkt der Ovulation erhöhten Östrogenproduktion aufzufassen; denn auch FREDRICSSON (1959) fand nach Östrogengaben bei kastrierten Kaninchen eine zahlenmäßige Zunahme der Sekretzellen.

Aus diesen Beobachtungen kann auch geschlossen werden, daß die von MILLESI (1963) und BERTALANFFY und LAU (1963) beschriebene geringfügige Zunahme der Mitoserate im Tubenepithel zum Zeitpunkt der Ovulation wahrscheinlich auf eine durch den höheren Östrogenspiegel hervorgerufene vermehrte Neubildung von Sekretzellen bedingt ist.

VI. Z u s a m m e n f a s s u n g

Nach H^3 -Thymidin-Injektionen wurde die Schleimhaut des Kanincheneileiters untersucht. Es wurde eine Differentialfärbung ausgearbeitet, mit deren Hilfe auch bei Autoradiogrammen Flimmerepithel- und Sekretzellen exakt unterschieden werden können.

Mit H^3 -Thymidin markierte Zellkerne wurden in Flimmerepithel- und Sekretzellen, sowie in Zellen, deren Kerne nahe der Basalmembran liegen, gefunden. Die Anzahl der markierten Kerne war gering.

Der Nachweis von Kernmarkierungen in Sekretzellen widerlegt die Auffassung, daß diese Zellen durch Umwandlung aus Flimmerepithelzellen entstehen. Sie sind zur selbständigen Regeneration durch mitotische Teilung befähigt.

Die Tatsache, daß keine Markierungen über Kernen von Stäbchenzellen auftreten, deckt sich völlig mit der Meinung anderer Autoren, die diese Zellen als Endzustand der Flimmerepithel- und Sekretzellen bezeichnet.

VII. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. BERTALANFFY, F. D., C. LAU
Mitotic rates, renewal times and cytodynamics of
the femal genital tract epithelium in the rat.
Acta Anat. (Basel) 54 (1963), 39
2. BORELL, U., O. NILSSON, J. WERSÄLL, A. WESTMAN
Electron-microscope studies of the epithelium
of the rabbit Fallopian tube under different
hormonal influences.
Acta obst. et gynec. scandinav. 35 (1956), 35
3. COHNEN, K.
Über den Mechanismus der Eiwanderung mit beson-
derer Berücksichtigung der zyklischen Veränderun-
gen am Eileiterepithel des Kaninchens.
Zschr. mikrosk.-anat. Forsch. 11 (1927), 472
4. ENBERGS, H.
Elektronenmikroskopische Untersuchungen am
Eileiterepithel des juvenilen Haushuhns.
Zbl. Veterinärmedizin (A) 16 (1968), 330
5. FAWCETT, D. W., K. R. PORTER
A study of fine structure of ciliated epithelia
J. Morphol. 94 (1954), 221
6. FEYRTER, F.
Über diffuse endokrine epitheliale Organe
J. A. Barth-Verlag, Leipzig, 1938
7. FEYRTER, F.
Über das urogenitale Helle-Zellen-System des
Menschen.
Zschr. mikrosk.-anat. Forsch. 57 (1951), 324
8. FLIERKO, B.
Die Epithelien des Eileiters und ihre hormonalen
Reaktionen.
Zschr. mikrosk.-anat. Forsch. 61 (1955), 99
9. FREDRICSSON, B.
Proliferation of rabbit oviduct epithelium after
estrogenic stimulation, with reference to the
relationship between ciliated and secretory cells.
Acta morph. neerl. scandinav. 2 (1959), 193
10. FREDRICSSON, B.
Studies of the morphology and histochemistry of
the Fallopian tube epithelium.
Acta anat. Suppl. 37 (1959), 1

11. FREDRICSSON, B.
Histochemical observations on the epithelium of the human Fallopian tubes
Acta obst. et gynec. scandinav. 38 (1959), 109
12. FREDRICSSON, B., N. BJÖRKMANN
Studies on the ultrastructure of the human oviduct epithelium in different functional states.
Z. Zellforsch. 56 (1962), 387
13. FRÖMMEI, R.
Beitrag zur Histologie der Eileiter
Verh. dtsh. Ges. Gynäk. 1 (1886), 95
14. GIANELLI, L.
Ricerche istologiche sull'Ovidutto dei Mammiferi
Arch. ital. anat. embriol. 6 (1907), 1
15. HASHIMOTO, M., T. SHIMOYAMA, M. KOSAKA, A. KOMORI, T. HIRASAWA, Y. YOKOYAMA, N. KAWASE, T. NAKAMURA
Electron microscopic studies on the epithelial cells of the human Fallopian tube II
J. Jap. obst. gynec. Soc. (Eng. Ed.) 11 (1964), 92
16. HOLZBACH, E.
Vergleichende anatomische Untersuchungen über die Tubenbrunst und die Tubenmenstruation.
Zschr. Geburtsh. 61 (1908), 565
17. HOTCHKISS, R. D.
A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations
Arch. Biochem. 16 (1948), 131
18. HOWARD, A., S. R. PELC
Nuclear incorporation of P^{32} as demonstrated by autoradiographs
Exp. Cell. Res. 2 (1951), 178
19. HUGHES, W. L., V. P. BOND, G. BRECHER, E. P. CRONKITE, R. B. PAINTER, H. QUASTLER, F. G. SHERMAN
Cellular proliferation in mouse as revealed by autoradiography with triated thymidine
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 44 (1958), 476
20. IAWATA, M.
Beiträge zur Morphologie der menschlichen Tube.
Mschr. Geburtsh. Gynäk. 81 (1929), 283

21. JÄGEROOS, B. H.
Zur Kenntniss der Veränderungen der Eileiterschleimhaut während der Menstruation
Zschr. Geburtsh. Gynäk. 72 (1912), 28
22. KIPFER, K.
Die Muskulatur der Tuba uterina als funktionelles System
Acta Anat. 9 (1950), 35
23. KLEIN, E.
Mitteilungen aus dem Forschungslaboratorium der AGFA Leverkusen - München, Bd. II, S. 43
Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958
24. KURY, G., L. H. REV-KURY
Metabolism of human Fallopian tube epithelium.
A radiographic study
Am. J. Obstetr. Gynec. 104 (1969), 523
25. LAJTHA, L. G., R. OLIVER
The application of autoradiography in the study of nucleic acid metabolism
Lab. Invest. 8 (1959), 215
26. LINARI
Ann. Fac. Med. Perugia 4 (1904), 131
zit. n. SCHAFFER, J.
Mschr. Geburtsh. Gynäk. 28 (1908), 526
27. McMANUS, J. F. A.
Histological demonstration of mucin after periodic acid
Nature 158 (1946), 202
28. MERCHANT, H.
Secretory granules in ciliated cells of the rabbit oviduct
Exp. Cell. Res. 56 (1969), 171
29. von MIHALIK, P.
Die Bildung des Flimmerapparates im Eileiterepithel des Menschen
Zschr. mikrosk.-anat. Forsch. 36 (1934), 459
30. von MIHALIK, P.
Über die Bildung des Flimmerapparates im Eileiterepithel
Anat. Anz. 79 (1934/35), 259
31. von MIHALIK, P.
Nachtrag zur Arbeit über die Bildung des Flimmerapparates im Eileiterepithel
Anat. Anz. 81 (1935/36), 60

32. von MIHALIK, P.
Flimmerblasen im Epithel der Luftwege
Zschr. Zellforsch. 23 (1936), 510
33. MILLESI, H.
Über die „Hellen Zellen“ der Tubenschleimhaut bei
Tubargravidität
Virchows Arch. 324 (1953), 221
34. MOREAUX, R.
Sur l'existence des phénomènes sécrétoires dans
l'épithel de la trompe utérine.
C. r. Assoc. anat. 13
zit. n. TRÖSCHER, H.
Über den Bau und die Funktion des Tubenepithels beim
Menschen
Mschr. Geburtsh. Gynäk. 45 (1917), 205
35. MÜLLER, H. G.
Das Vorkommen Heller Zellen im Eileiter der Frau
Zbl. Gynäk. 74 (1952), 1182
36. MÜLLER, H. G.
Der Eiweißstoffwechsel der befruchteten und un-
befruchteten Säugetierzelle
Z. ges. exp. Med. 135 (1962), 343
37. NEUMANN, E.
Die Beziehung des Flimmerepithels der Bauchhöhle
zum Eileiterepithel beim Frosche. Anhang: Die
Drüsen der Froscheileiter
Arch. mikrosk. Anat. 11 (1875), 354
38. NILSSON, O., U. RUTBERG
Ultrastructure of secretory granules in post-
ovulatory rabbit oviduct
Exp. Cell. Res. 21 (1960), 622
39. NOVAK, E., H. S. EVERETT
Cyclical and other variations in the tubal epithelium
Am. J. Obstetr. Gynec. 16 (1928), 499
40. OVERBECK, L.
Zur Ultrastruktur des Tubenepithels
Arch. Gynäk. 204 (1967), 58
41. PAPANICOLAOU, G. N., H. F. TRAUT, A. A. MARCHETTI
The epithelia of womans reproductive organs.
A correlative study of cyclic changes
The Commonwealth Fund. New York 1948

42. PAUERSTEIN, C. J., J. D. WOODRUFF
The role of the "indifferent" cell of the tubal
epithelium
Am. J. Obstetr. Gynec. 98 (1967), 121
43. PELC, S. R.
Autoradiographic studies
Nature 160 (1947), 749
44. REICHARD, P., B. ESTBORN
Utilization of desoxyribosides in synthesis of
polynuceotides
J. Biol. Chem. 188 (1951), 839
45. SCHAFFER, J.
Über Bau und Funktion des Eileiterepithels beim
Menschen und Säugetier
Mschr. Geburtsh. Gynäk. 28 (1908), 526
46. SCHAFFER, J.
Lehrbuch der Histologie und Histogenese
Urban & Schwarzenberg, Wien und Berlin 1933
47. SCHLEMMINGER, W.
Über die Hellen Zellen in der Tube
Beitr. Path. Anat. 108 (1943), 131
48. SCHRÖDER, R.
Der Eileiter
In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des
Menschen
von MÖLLENDORF, Bd. VII, Teil 1 ;
Springer-Verlag, Berlin 1930
49. SCHULTKA, R.
Der Sekretionszyklus der Flimmerzellen der mensch-
lichen Tuba uterina auf Grund cytologischer und
cytotopochemischer Untersuchungen
Acta histochem. 15 (1963), 285
50. SCHULTKA, R., I. H. SCHARF
Sekretionszyklus der Tubenepithelzellen in Ab-
hängigkeit vom ovariellen Zyklus
Zbl. Gynäk. 85 (1963), 1601
51. SNYDER, F. F.
Changes in the Fallopian tube during the ovulation
cycle and early pregnancy
John Hopkins Hosp. Bull. 34 (1923), 121
52. SNYDER, F. F.
Changes in the human oviduct during the menstrual
cycle and pregnancy
John Hopkins Hosp. Bull. 35 (1924), 141

53. STEEDMAN, H. F.
Alcian blue 8 GS: a new stain for mucin
Quart. J. Microsc. Sci. 91 (1950), 477
54. STEGNER, H. E.
Das Epithel der Tuba uterina des Neugeborenen.
Elektronenmikroskopische Befunde.
Z. Zellforsch. 55 (1961), 247
55. STEGNER, H. E.
Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die
Sekretionsmorphologie des menschlichen Tubenepithels.
Arch. Gynäk. 197 (1962), 351
56. STÜVE, R.
Zur Kenntniss des Baues der Eileiterdrüsen bei den
Amphibien
Arch. mikrosk. Anat. 34 (1889), 123
57. TRÜSCHER, H.
Über den Bau und die Funktion des Tubenepithels
beim Menschen
Mschr. Geburtsh. Gynäk. 45 (1917), 205
58. VOINOT
Essai sur l'épithélium de la trompe de Fallope
chez la femme.
Thèse. Nancy 1900
zit. n. TRÜSCHER, H.
Mschr. Geburtsh. Gynäk. 45 (1917), 205
59. WESTMAN, A.
Sezernierende Zellen im Epithel der Tubae uterinae
Fallopil
Anat. Anz. 49 (1916), 335
60. ZIMMERMANN, W.
Untersuchungen über den Ort der Besamung
transplantierter und nicht transplantierter
Kanincheneier
Verh. Dtsch. Zool. Ges. Münster/Westf., p. 91 (1959)

VIII. L e b e n s l a u f

03. 10. 1943 als Tochter des Landwirtes Egon Eckardt und seiner Ehefrau Gerda, geb. Oder, in Milda bei Jena geboren.
- 1950 - 1964 Besuch der folgenden Schulen:
- 1950 - 1958 Grundschule in Milda
- 1958 - 1959 Mittelschule in Jena-Winzerla
- 1959 - 1960 Oberschule in Jena
- 1960 - 1962 Aufbaugymnasium in Bensheim/ Bergstraße
- 1962 - 1963 Aufbaugymnasium in Friedberg
- 1963 - 1964 Schillerschule in Friedberg. Abitur.
- 1964 - 1970 Studium der Medizin an der Justus Liebig-Universität, Gießen.
- April 1965 naturwissenschaftliche Vorprüfung
- Oktober 1966 ärztliche Vorprüfung
- Februar 1970 ärztliche Prüfung
- 1969 Vermählung mit Herrn Neithard Grund und Geburt unseres Sohnes Gerald
- 1970 - 1971 Medizinalassistentin an der Universitäts-Frauenklinik, Gießen, an der Chirurgischen Universitätsklinik, Gießen und am Bundeswehrkrankenhaus Gießen.
- März 1971 Approbation als Ärztin
- Seit
Mai 1972 Assistenzärztin am Hüttenhospital Dortmund-Hörde

Herrn Professor Dr. med. H. Koester,
Städtische Frauenklinik Dortmund,
danke ich für die Überlassung des
Themas sowie die wissenschaftliche
Anleitung und Unterstützung.

